

文章编号:1000-7423(2004)-02-0076-04

日本血吸虫组织蛋白酶 L1 基因在大肠埃希菌中的表达

易冰 李卓雅 何蔼 郑小英 郑斌 周豪杰 王轶 张瑞林 余南 詹希美*

【摘要】 目的 在原核表达体系大肠埃希菌中进行日本血吸虫组织蛋白酶 L1 (SjCL1) 基因表达。方法 通过 PCR 从质粒 pcDNA3-SjCL1 中扩增得到 SjCL1 基因,定向克隆至原核表达载体 pGEX-4T-1 中,构建重组质粒 pGEX-SjCL1,将该重组质粒转化大肠埃希菌 JM109,转化子经异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导表达,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和蛋白质印迹法 (Western blotting) 分析 SjCL1 基因表达产物。结果 获得长约 1 kb 的 PCR 片段,构建了 pGEX-SjCL1 质粒。SDS-PAGE 和 Western blotting 检测表达产物,相对分子质量为 62 000。结论 SjCL1 基因在大肠埃希菌中以融合形式得到表达。

【关键词】 日本血吸虫;组织蛋白酶类;基因表达

中图分类号:R383.24

文献标识码:A

Expression of Proteinase Cathepsin L1 Gene of *Schistosoma japonicum* in *Escherichia coli*

YI Bing, LI Zhuo-ya, HE Ai, ZHENG Xiao-ying, ZHENG Bin, ZHOU Hao-jie, WANG Yi, ZHANG Rui-lin, YU Nan, ZHAN Xi-mei*

(Department of Parasitology, Zhong Shan Medical College, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510089, China)

【Abstract】 **Objective** To express the proteinase cathepsin L1 gene of *Schistosoma japonicum* (SjCL1) in *Escherichia coli* JM109 cells. **Methods** The SjCL1 gene was amplified from the recombinant plasmid pcDNA3-SjCL1 by PCR. The gene was cloned into a prokaryotic expression vector pGEX-4T-1 to construct a recombinant plasmid pGEX-SjCL1. The *E. coli* JM109 cells were transformed with the recombinant plasmid pGEX-SjCL1 and the transformants were induced by IPTG to express the recombinant protein, the target protein was then identified by SDS-PAGE and Western blotting. **Results** A 1 kb length PCR product was obtained and a recombinant plasmid pGEX-SjCL1 was constructed. The expression product was detected by SDS-PAGE and Western blotting and an expression band about 62 000 was found. **Conclusion** The SjCL1 gene is effectively expressed in the *E. coli* JM109 cells.

【Key words】 *Schistosoma japonicum*; cathepsins; gene expression

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 301708377)

* Corresponding author

雷智刚等^[1]首次完成了日本血吸虫组织蛋白酶 L1 (SjCL1) 基因的编码区全序列分析及克隆,并在 COS-7 细胞和 CHO-K1 细胞株中成功表达。为了获取大量 SjCL1 基因,进一步分析其生物学性质,探讨其对研制疫苗和开发新药的意义,本实验将 SjCL1 基因克隆到原核表达载体 pGEX-4T-1 中,分析其在大肠埃希菌 JM109 菌株中的表达形式及动态。

材料与方 法

1 菌株与质粒

大肠埃希菌 JM109 菌株、原核表达质粒 pGEX-4T-1 (德国 Amersham Biosciences 公司)由本室保存,重组质粒 pcDNA3-SjCL1 由本室构建保存。

2 主要试剂及酶类

Pyrobest™ DNA 聚合酶为大连 TaKaRa 产品,脱氧核糖三磷酸 (dNTP) 为上海生物工程技术服务有限公司产品,PCR 纯化试剂盒 (QIAquick PCR Purification Kit) 和质粒提取试剂盒 (QIAprep Spin Miniprep Kit) 为德国 Qiagen 公司产品,内切酶 *Xho*I 和 *Bam*HI 分别为立陶宛 MBI 和美国 New England Biolabs 产品,快速 DNA 连接试剂盒为立陶宛 Fermentas 产品,氨基青霉素和琼脂糖为加拿大 BBI 产品,硝酸纤维素膜为美国 Pall Gelman Laboratory 产品,山羊抗谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 抗体为德国 Amersham Biosciences 产品,辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊 IgG (IgG-HRP) 和山羊抗兔 IgG-HRP 为武汉博士德生物工程有限公司产品;其余化学试剂均为国产分析纯;感染日本血吸虫兔血清自制。

3 引物

根据雷智刚等^[1]报道的日本血吸虫中国大陆株

基金项目:国家自然科学基金 (No. 301708377)

作者单位:中山大学中山医学院寄生虫学教研室,广州 510080

* 通讯作者

SjCL1 cDNA 编码区全序列, 结合 PCGENE 和 PCRDE-SIGN 软件分析设计特异引物:

上游引物, SL1P1: 5'-GCG GGA TCC ATC CCT
BamHI酶切位点

CAA AAC TTA GAG-3'

下游引物, SL1P2: 5'-GCC G CT CGA G TT TAG
XhoI酶切位点

TAG ATC AAA GCT G-3'

由上海生物工程技术有限公司合成。

4 PCR 扩增 SjCL1 基因

采用 QIAprep Spin Miniprep Kit (德国 Qiagen 公司) 提取 pcDNA3-SjCL1 质粒, 具体操作步骤按试剂盒说明书进行。以 pcDNA3-SjCL1 质粒为模板, 用特异引物 SL1P1 和 SL1P2 进行 PCR, 扩增 SjCL1 基因, 反应总体积为 50 μ l, 按以下条件扩增: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 57 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1.2% 琼脂糖凝胶电泳观察分析 PCR 结果。PCR 产物的纯化按 QIAquick Purification Kit 说明进行。

5 表达质粒 pGEX-SjCL1 的构建与鉴定

将纯化的 PCR 产物与质粒 pGEX-4T-1 分别用 *Bam*HI 和 *Xho*I 进行双酶切, 纯化回收双酶切产物, 以 3:1~4:1 摩尔浓度比, 用 T4DNA 连接酶将双酶切后的 SjCL1 基因片段和双酶切后的质粒 pGEX-4T-1 进行连接, 将连接产物转化感受态细菌 JM109, 在 LB/Amp 平板上挑选氨苄青霉素抗性菌落, 小量提取质粒 DNA, 以已知 pGEX-4T-1 环形质粒为空白对照, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳比较分析其泳速, 泳速较 pGEX-4T-1 环形质粒慢者可能为插入外源基因的重组质粒; 将重组质粒进一步作 *Bam*HI、*Xho*I 双酶切和 PCR 鉴定, 该重组质粒命名为 pGEX-SjCL1。然后, 将此阳性克隆委托上海博亚公司用 pGEX 通用引物进行序列测定, 运用 PCGENE 软件进行序列同源性分析。

6 SjCL1 基因的表达及检测

将阳性转化子接种于 LB/Amp 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡过夜, 然后以 1:50 稀释接种于 LB/Amp 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C、250 rpm 振荡 4 h, 使达到对数生长期, 添加异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度 1 mol/L, 继续振荡培养 5 h, 收集诱导前及诱导后每小时的菌液各 1 ml, 用于十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和蛋白质印迹法 (Western blotting) 分析。

7 菌体总蛋白的 SDS-PAGE 电泳

参照文献 [2] 进行, 凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色。

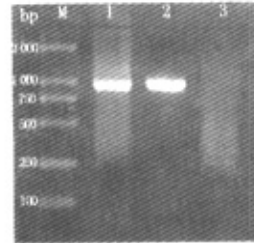
8 菌体总蛋白的 Western blotting 分析

参照文献 [3] 进行, 第一抗体分别为山羊抗 GST 抗体 (1:1 000) 和感染日本血吸虫兔血清 (1:100), 第二抗体分别为兔抗山羊 IgG-HRP (1:2 000) 和山羊抗兔 IgG-HRP (1:2 000)。

结 果

1 SjCL1 全长基因的 PCR 扩增

用所设计合成的特异引物从质粒 pcDNA3-SjCL1 中扩增出 SjCL1 基因, 大小约 1 kb, 与理论值 955 bp 大小相符 (图 1)。

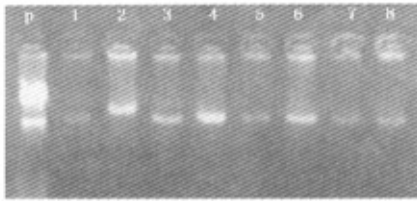


M 标志物 DL2000 1,2 SjCL1 基因 PCR 产物 3 空白对照
 M Marker DL2000 1,2 PCR products 3 Blank control

图 1 SjCL1 基因 PCR 产物
 Fig. 1 PCR product of the SjCL1 gene

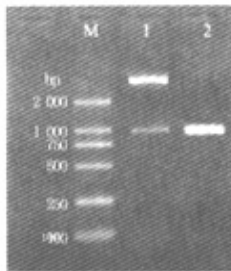
2 表达质粒 pGEX-SjCL1 的构建与鉴定

将扩增的目的基因纯化后与原核表达载体 pGEX-4T-1 连接、转化, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析后, 在随机挑选的 8 个克隆中初步筛选出 1 个较环形 pGEX-4T-1 泳速慢的重组子 (图 2), 此重组子通过 PCR 及 *Bam*HI、*Xho*I 双酶切鉴定均可得到大小与预期一致的 DNA 片段 (图 3); 运用 PCGENE 软件分析比较测序结果 (图 4) 与 GenBank 中国大陆株 SjCL1 序列 (AF510740)^[4] 的同源性达 98.9%, 推导氨基酸序列同源性为 97.8%。其中, 有 10 个碱基存在差异, 分别位于第 179 位 C-A, 第 283 位 C-T, 第 285 位 A-G, 第 489 位 T-A, 第 493 位 T-C, 第 608 位 G-C, 第 669 位 T-C, 第 719 位 T-C, 第 780 位 T-C, 第 929 位 G-A; 其对应的氨基酸序列存在 7 个位点的差异, 分别在第 60 位 Ser-Tyr, 第 95 位 Pro-Ser, 第 163 位 Asp-Glu, 第 165 位 Cys-Arg, 第 203 位 Gly-Ala, 第 240 位 Leu-Pro, 第 310 位 Gly-Asp; 这些点突变均位于非保守区域或非功能区域中; 而第 669 和 780 位是同义突变。



pCEX-4T-1 质粒 1,3-8 阴性克隆 2 阳性重组质粒
pGEX-4T-1 plasmid 1, 3-8 Negative clones 2 Recombinant plasmid

图 2 重组质粒 pGEX-SjCL1 初筛电泳图
Fig. 2 Screening of pGEX-SjCL1



M 标志物 DL2000 1 pGEX-SjCL1 双酶切 (*Bam*HI + *Xho*I) 2 PCR 产物
M Marker DL2000 1 Recombinant pGEX-SjCL1 digested by *Bam*HI and *Xho*I 2 PCR product

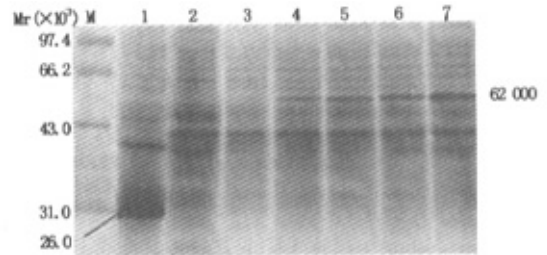
图 3 重组质粒 pGEX-SjCL1 的酶切及 PCR 鉴定
Fig. 3 Identification of pGEX-SjCL1

ATGGCTCAAACTTAGAGTACCTACCTTTGAACTACCTCAAAATGTAGTGCAGATGTATGGAC
AATTTAAATTAACCTATAGAACAACGATATCATGAACACAGATAATGAGAAGATTTAGCATCTT
TAAGCTAATCTACTAAGGCACAAATATATCAATCACTTGAAGAGGTATATCGCTTTACGGC
GTGACACTTTATTCAGATTTAACAACCTGACGAATCTCCAGTACTCCACTTACTCTCTTGA
GGGCATCTAGTAAAGCCACACAAATTTCCACTCCAGAGAAGCTTGGGATATACCAAAATATTT
CGACTGAGAGAGAGAGGUTGCTGTACTCACTCAAGTCAAGCAATCAAGGATCTGTGATCATCTGG
GCATCTCCACCACTGGTAAATATGAGACTCAATGTGCTCAAACTCGAAAATTAATATCAT
TAAGTCAACAGCAACTCTGCACTGCAATATCTCATATGATGAGGCTCAATGCTGCTCAACATC
TAACTTATGATCAATAATACCAATGGTGTATTAACTCTCAAGATAATATCCCTAAGAT
GCTAAGATGAGAATCCCTCAAAATTTCCAGCTGCTGGCTTATATTAATGTCAGTAA
ATTTAATCGAGATGATCAGAACTTGGCATTTGGATTTATATCAATCAAGCAATAAGTCTGG
CATCAATGCTTACCTTTACAGTTTATTCACATGGAAATATATCACTCCCTGGATCTCTCT
TCAAACTATCTCTTATATGATGCTCTCTTAACTTCTGGGTTATGAGGCTCTCTGAGAAGATGAGC
CCTCTGATCTGGAAGAATAGCTGGGCTTCAATGGCTGAAAGGCTATTCTTGGATGTA
TCGAGGTGATCTACTTCTGTATTATACAGATCTACATCAGCTTGTGATCTACTAA

图 4 SjCL1 基因测序图
Fig. 4 Sequence of the SjCL1 gene

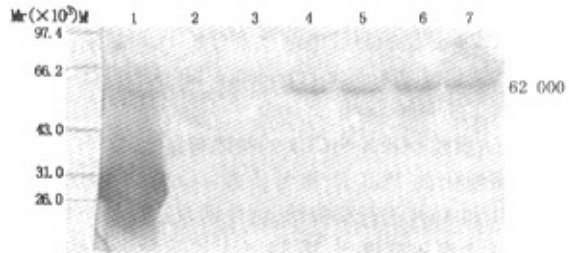
3 重组蛋白的鉴定

离心取 IPTG 诱导前后细菌,进行 SDS-PAGE,结果(图 5)表明诱导菌在相对分子质量 (Mr) 约 62 000 处出现明显的蛋白条带,且其表达量随诱导时间延长而增加,至 4 h 达高峰;而对照组未见相应条带,提示该条带为载体和 SjCL1 基因的融合表达产物 (SjCL1-GST)。Western blotting 结果(图 6,7)亦显示诱导菌约在 Mr 62 000 处有条带被抗 GST 抗体和感染日本血吸虫兔血清识别;而 pGEX-4T-1/JM109 菌经诱导表达的 GST 条带 (Mr 26 000) 也为抗 GST 抗体所识别。



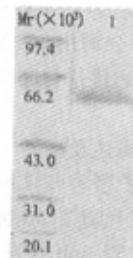
M 蛋白质标志物 1 IPTG 诱导 pGEX-4T-1/JM109 对照 2 JM109 对照 3 IPTG 诱导前 pGEX-SjCL1/JM109 4,5,6,7 IPTG 诱导后第 1, 2,3,4 小时 pGEX-SjCL1/JM109
M Protein marker 1 pGEX-4T-1/JM109 induced by IPTG 2 JM109 induced by IPTG 3 pGEX-SjCL1/JM109 uninduced 4,5,6,7 pGEX-SjCL1/JM109 induced by IPTG 1,2,3,4 h respectively

图 5 SDS-PAGE 结果
Fig. 5 The result of SDS-PAGE



M 蛋白质标志物 1 IPTG 诱导 pGEX-4T-1/JM109 对照 2 JM109 对照 3 IPTG 诱导前 pGEX-SjCL1/JM109 4,5,6,7 IPTG 诱导后第 1, 2,3,4 小时 pGEX-SjCL1/JM109
M Protein marker 1 pGEX-4T-1/JM109 induced by IPTG 2 JM109 induced by IPTG 3 pGEX-SjCL1/JM109 uninduced 4,5,6,7 pGEX-SjCL1/JM109 induced by IPTG 1,2,3,4 h respectively

图 6 抗 GST 抗体的 Western blotting 结果
Fig. 6 Results of Western blotting analyzed by anti-GST antibody



M 蛋白质标志物 1 IPTG 诱导第 4 小时 pGEX-SjCL1/JM109
M Protein marker 1 pGEX-SjCL1/JM109 induced by IPTG 4 h

图 7 感染日本血吸虫兔血清的 Western blotting 结果
Fig. 7 Results of Western blotting analyzed by rabbit anti-*S. japonicum* sera

讨 论

组织蛋白酶 L1 是降解血红蛋白 (Hb) 的关键酶之

一^[1,4,5],由于血吸虫组织蛋白酶 L 与哺乳动物以及人的同系物序列不同,包括活性位点氨基酸残基的差异以及对抑制剂 diazomethanes 的敏感性存在差异^[6,7],因此,寻找选择性抑制血吸虫组织蛋白酶 L 的药物是可行的。体内外实验均表明针对半胱氨酸蛋白水解酶的药物具有抗血吸虫效果^[8]。

日本血吸虫 SjCL1 含量较低,且与 SjCL2 的分子及底物特异性相似。因此,从血吸虫体内分离纯化大量的 SjCL1 分析其生化活性,困难较大。随着基因工程技术的发展,运用基因重组技术获得蛋白的高效表达并分离纯化,大量获取 SjCL1 成为可能。本研究室雷智刚首次完成了 SjCL1 基因的编码区全序列分析及克隆,构建了 pcDNA3-SjCL1 真核表达质粒^[1],分别在哺乳动物细胞 COS-7 和 CHO-K1 细胞株中实现了瞬时和稳定表达。但要从哺乳动物细胞表达系统获得大量 SjCL1 仍较难。

将克隆化基因导入大肠埃希菌,用于表达大量蛋白质的方法在蛋白质纯化、定位及功能分析等方面均有价值^[9]。本实验所选用的 GST 融合表达系统具表达效率高、便于纯化等优点,且利用 GST 与目的蛋白之间的凝血酶或 Xa 因子切割位点,可方便地得到目的蛋白。本实验通过设计特异引物,从质粒 pcDNA3-SjCL1 中扩增出 SjCL1 基因,将其插入原核表达载体 pGEX-4T-1 中,经琼脂糖凝胶电泳初筛、双酶切、PCR 鉴定及测序,确定 SjCL1 基因完整读码框的正确插入。虽然部分碱基存在点突变并导致相应位点氨基酸区突变,但因这些突变位点均位于非保守区域或非功能域,对于蛋白质的整体功能无明显影响。阳性转化子经 IPTG 诱导后,用 SDS-PAGE 分析其表达产物,结果显示 1 条 Mr 62 000 的特异蛋白条带,并且其表达量随

诱导时间延长而增加,至第 4 小时达高峰。据报道,SjCL1 基因编码的前酶原推导的为 Mr 36 100^[11,10],而 GST 的为 Mr 26 000,两者总和正好是 Mr 62 000。表明 SjCL1 基因在大肠埃希菌中与 GST 以融合形式得到了表达,而分别用抗 GST 抗体和感染日本血吸虫兔血清所作的 Western blotting 分析也进一步证实了这一结果。

本实验结果为进一步研究 SjCL1 基因的生物学功能提供了条件。

参 考 文 献

- [1] 雷智刚,孟锦绣,何嵩,等.日本血吸虫组织蛋白酶 L1 基因的编码区全序列分析及克隆[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2002,20: 325-327.
- [2] J 萨姆布鲁克,EF 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯.分子克隆实验指南[M].第 2 版.金冬雁,黎孟枫等译.北京:科学出版社,1992. 880-886.
- [3] J 萨姆布鲁克,EF 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯.分子克隆实验指南[M].第 2 版.金冬雁,黎孟枫等译.北京:科学出版社,1992. 888-898.
- [4] Brady CP, Dowd AJ, Brindley PJ, et al. Recombinant expression and localization of *Schistosoma mansoni* cathepsin L1 support its role in the degradation of host hemoglobin[J]. Infect Immun, 1999, 67: 368-374.
- [5] Smith AM, Dalton JP, Clough KA, et al. Adult *Schistosoma mansoni* express cathepsin L proteinase[J]. Mol Biochem Parasitol, 1994, 67: 11-19.
- [6] Dalton JP, Clough KA, Jones MK, et al. Characterization of the cathepsin-like cysteine proteinase of *Schistosoma mansoni*[J]. Infect Immun, 1996, 64: 1328-1334.
- [7] Michel A, Ghoneim H, Resto M, et al. Sequence, characterization and localization of a cysteine proteinase cathepsin L in *Schistosoma mansoni*[J]. Mol Biochem Parasitol, 1995, 73: 7-18.
- [8] Wasilewski MM, Lim KC, Phillips J, et al. Cysteine proteinase inhibitors block schistosome hemoglobin degradation *in vitro* and decrease worm burden and egg production *in vivo*[J]. Mol Biochem Parasitol, 1996, 81: 179-189.
- [9] J 萨姆布鲁克,EF 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯.分子克隆实验指南[M].第 2 版.金冬雁,黎孟枫等译.北京:科学出版社,1992. 822.
- [10] Day SR, Dalton JP, Clough KA, et al. Characterization and cloning of the cathepsin L proteinases of *Schistosoma japonicum*[J]. Biochem Biophys Res Comm, 1995, 217: 1-9.

(收稿日期:2003-08-11 编辑:伯寿)

《中国卫生工程学》征订启事

《中国卫生工程学》杂志系国家卫生部主管、中华预防医学会、吉林省预防医学会主办的国家级科技期刊。本刊为中华预防医学会系列杂志之一,是全国卫生工程学科惟一的专业期刊。本刊适于从事卫生工程和食品卫生、环境卫生、劳动卫生、放射卫生与防护、学校卫生、卫生法学等专业的科技工作者及大专院校卫生学、环境科学、给水排水、空调通风等专业师生阅读。

本刊欢迎有关下列内容的稿件:卫生工程学的核理论,给水排水、空调通风、学校卫生、空气净化、防尘防毒、饮用水处理、垃圾粪便的无害化等研制的新设备、新产品、新仪器、新技术、新方法及其卫生效果评价和卫生评估等;大型工业企业、乡镇企业、合资企业、水利工程等新建、扩建、续建项目的预防性卫生监督及卫生学评价等。

本刊设有论著、评论、调查研究、技术与方法、经验交流、综述、讲座,专题讨论、国外信息、论文摘要、基层园地等栏目。

《中国卫生工程学》杂志为季刊,大 16 开本,正文 64 页,每季中月 20 日出版,每册定价 6.00 元,全年 24.00 元。全国各地邮局(所)均可订阅,本刊邮发代号 12-126。

邮局汇款 吉林省长春市工农大路 1313 号,《中国卫生工程学》杂志编辑部,唐旭收。

银行汇款 户名:《中国卫生工程学》杂志编辑部,开户行:长春市工商银行红旗分理处。账号:4200221509000068123。

编辑部地址:吉林省长春市工农大路 1313 号,联系电话:0431-5919470,传真:0431-5953475。联系人:唐旭。E-mail:JLPM